



**You have downloaded a document from
RE-BUS
repository of the University of Silesia in Katowice**

Title: Prosionek - usługowy heavymetalowiec w biomonitoringu środowiska

Author: Monika Tarnawska

Citation style: Tarnawska Monika. (2006). Prosionek - usługowy heavymetalowiec w biomonitoringu środowiska. W: M. Nakonieczny (red.), "Problemy środowiska i jego ochrony" Cz. 14 (S. 55-83). Katowice : Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego.



Uznanie autorstwa - Użycie niekomercyjne - Bez utworów zależnych Polska - Licencja ta zezwala na rozpowszechnianie, przedstawianie i wykonywanie utworu jedynie w celach niekomercyjnych oraz pod warunkiem zachowania go w oryginalnej postaci (nie tworzenia utworów zależnych).



UNIwersYTET ŚLĄSKI
W KATOWICACH



Biblioteka
Uniwersytetu Śląskiego



Ministerstwo Nauki
i Szkolnictwa Wyższego

Monika Tarnawska

**Prosionek
– usłużny heavymetalowiec
w biomonitoringu środowiska**

Uniwersytet Śląski
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Katowice

Dr Monika Tarnawska – ekotoksykolog, adiunkt w Katedrze Fizjologii Zwierząt i Ekotoksykologii Uniwersytetu Śląskiego. Specjalizuje się w ekotoksykologii bezkręgowców, w tym szczególnie skorupiaków lądowych. Uczestniczyła w kilku projektach badawczych prowadzonych w ramach porozumienia dwustronnego między rządami Polski i Republiki Południowej Afryki. Zaowocowało to m. in. udziałem w badaniach terenowych w RPA oraz pobytem w ośrodku nuklearnym iThemba LABS w Somerset West; gdzie uczyła się, a następnie wykonywała analizy mapowania pierwiastków z użyciem mikrowiązki protonowej (*particle-induced X-ray emission*).

Jest jednym z nauczycieli akademickich prowadzących zajęcia dotyczące problematyki środowiskowej dla studentów i doktorantów Uniwersytetu Śląskiego w ramach Balic University Programme koordynowanego przez Uniwersytet w Uppsali.

Wygląda niepozornie: małe, nie przekraczające 18 mm, szare, owalne stworzonko z wyraźnie zaznaczonymi segmentami „pancerzyka”, spod których wysuwają się liczne odnóża. Prosoniek, czyli stonóg szorstki wbrew polskiej nazwie gatunkowej, stąpa na czernastu nóżkach i przemyka cichcem, gdy tylko zapadnie zmrok.

Napotkany – przywodzi na myśl małego karalucha, choć w istocie bliżej jest spokrewniony z rakiem niż z jakimkolwiek owadem. Widywany jest z rzadka, choć każdy z nas miją go niemal co dzień, schodząc do piwnicy lub otwierając garaż – takie bowiem miejsca prosoniek wybiera sobie na mieszkanie. Nie jest sąsiadem uciążliwym: jest bezbronny, nie jest agresywny, nie zostawia śmieci, a niektóre z nich wręcz pożera, no i nie robi hałasu. Nie może mieć więc nic wspólnego z heavy metalem, choć już z metalami ciężkimi – owszem, bardzo wiele.

Ta drobna istotka posiada bowiem cechę, która w oczach ekotoksykologa czyni ją wielką: gdy w zamieszkiwanym środowisku zmuszona jest odżywiać się pokarmem zanieczyszczonym metalami, lokuje je w komórkach swej wątrobotrzustki i przechowuje tam przez resztę swego trzyletniego życia. Każdy kolejny posiłek tego skorupiaaka, zwłaszcza jeśli żyje on w pobliżu huty, autostrady czy zakładu przemysłowego, zwiększa stężenie metali w jego ciele. Swoisty zapis prosonkowego jadłospisu w czasie określonego wycinka życia skorupiaaka jest cennym źródłem informacji, z których korzysta ekotoksykologia, a sam stonóg znalazł się w panteonie biowskaźników. Jest bohaterem prac naukowych, książek popularyzatorskich i podręczników akademickich.

Kariera naukowa godna – nie przymierzając – heavymetalowego showbiznesu, i to bez doktoratu. Poznajmy zatem kolejnego z naszych sąsiadów, któremu nie strasza jest ludzka działalność, zmieniająca naturalne ekosystemy. Czy doceniając jego zalety, możemy coś zrobić dla prosonka? Owszem, pozostawić w kącie ogrodu kilka butwiejących desek, niewielką stertę liści i kilka większych kamieni, aby mógł przetrwać kolejną zimę (przyp. red. z serwisu internetowego www.us.edu.pl).

Równonogi lądowe (*Isopoda*), do których należy prosionek szorstki (*Porcellio scaber*) są jedynymi skorupiakami, które opanowały to środowisko; występują niemal we wszystkich ekosystemach i siedliskach lądowych, nawet na pustyniach [SUTTON, 1980; WARBURG, 1995]. Gatunkowe bogactwo *Isopoda* zależy od typu siedliska ale również w przypadku siedlisk ubogich w gatunki ich liczebność może być znaczna. Dane dotyczące zagęszczenia i biomasy tej grupy zwierząt są bardzo rozbieżne nawet w obrębie jednego gatunku i zależą od warunków klimatycznych, typu siedliska oraz jego przestrzennego zróżnicowania [DAVIS i in., 1977, HORNUNG i WARBURG, 1995]. W przypadku zagrożenia ogólną reakcją obronną równonogów są zachowania agregacyjne. W ciągu dnia ukrywają się pod kamieniami, konarami drzew, warstwą liści, czyli w miejscach o wysokiej wilgotności [HORNUNG, 1991]. Jako że są to zwierzęta o aktywności nocnej, ich naturalnymi wrogami są głównie chrząszcze z rodziny biegaczowatych (*Carabidae*), aktywnie polujące, nie budujące sieci pająki z rodziny pogońcowatych (*Lycosidae*), wije, ropuchy i polujące nocą ptaki [SUTTON, 1980].

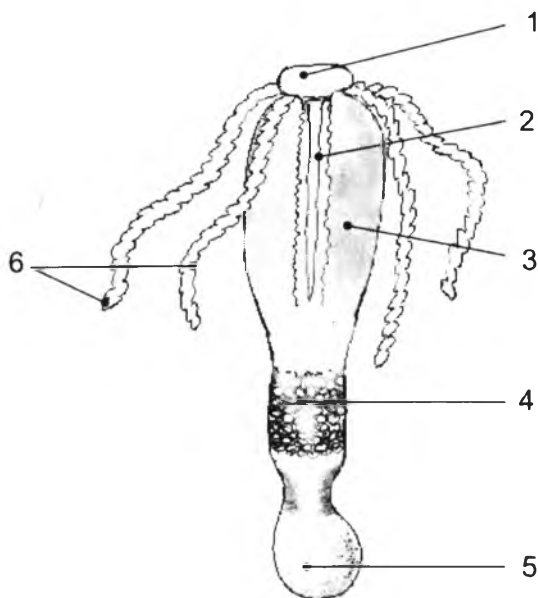
Równonogi odżywiają się materią organiczną, preferując rozkładające się liście, głównie roślin dwuliściennych. Konsumpcja ściółki przez *Isopoda* przyczynia się bezpośrednio i pośrednio do jej rozkładu [HASSALL i in., 1987; VAN WENSEM, 1989]; bezpośrednio przez jej zjadanie i produkcję odchodów bogatych w substancje mineralne, a pośrednio poprzez stymulowanie aktywności mikrobiologicznej. Funkcja ekologiczna tych zwierząt, zaliczanych razem z krocionogami (*Diplopoda*) do kategorii makrodekoncentratorów, polega na fragmentacji martwego materiału roślinnego. W ten sposób udostępniają go skoczogonkom i roztoczom, które jako mikrodestruenci, pełnią podobną rolę w łańcuchu pokarmowym [DALLINGER i in., 1992].

Równonogi w środowisku zanieczyszczonym

Złożone zależności pomiędzy bezkręgowcami żyjącymi na powierzchni gleby, ich ciągły kontakt z glebą oraz fakt, że wiele z nich prowadzi raczej osiadły tryb życia sprawia, że mogą być one wykorzystane do bioindykacji zmian właściwości gleby, powstałych w sposób naturalny, a także pod wpływem działalności człowieka [VAN STRAALEN, 1998]. Organizmami modelowymi wykorzystywanymi w ocenie wpływu metali są wśród zwierząt glebowych głównie dżdżownice [MA, 1982; BENGTSOON i in., 1983; HONDA i in., 1984; VAN GESTEL i in., 1993], a wśród związanych z jej powierzchnią skoczogonki [VAN GESTEL i KOOLHAAS, 2004] oraz lądowe równonogi [DROBNE, 1997]. Wymienione powyżej grupy zwierząt cechuje zróżnicowana wrażliwość na metale [BARGAGLI, 1998].

Metale przenikają do wnętrza ciała bezkręgowców lądowych głównie przez nabłonek przewodu pokarmowego i cewki Malpighiego (u owadów), a zatem tam gdzie bariera jest najsłabsza, gdyż tworzy strukturę jednowarstwową. W mniejszym stopniu udział w tym mają powłoki ciała, które pokryte chityną i woskiem ograniczają do minimum transport przez powierzchnię ciała [MIGULA, 1991]. Analiza koncentracji metali w narządach i tkankach tych zwierząt może być drogą do określenia stopnia ich ekspozycji na metale ciężkie [TYLER i in., 1989].

Ze względu na zdolność do akumulowania metali Isopoda z terenów zanieczyszczonych mogą być wykorzystane do monitoringu skażenia metalami ciężkimi [HOPKIN, 1989; DALLINGER i in., 1992]. Wśród tej grupy bezkręgowców *Porcellio scaber* jest jednym z najbardziej odpowiednich gatunków, który może być wykorzystany do kontrolowania biodostępności metali w ekosystemach lądowych [HOPKIN i in., 1993]. Jest to bowiem gatunek pospolity zamieszkujący warstwę ściółki, a więc środowisko gdzie metale są najbardziej akumulowane [MARTIN i in., 1982]. Istnieje pogląd jakoby ocena stężeń metali w wątrobotrzustce tego gatunku była najprostszą miarą zanieczyszczenia gleby tymi ksenobiotykami. Mogą być także w tym celu użyte zmiany struktury komórek tego narządu [KÖHLER i in., 1996a]. Sprzyja temu specyficzna budowa i funkcja poszczególnych elementów układu trawiennego tych zwierząt (Rys. 1). W przewodzie pokarmowym Isopoda wyróżnia się: jelito przednie (*stomodeum*) i jelito tylne (*proctodeum*) – obydwa te odcinki mają pochodzenie ektodermalne, i pokryte są od strony światła jelita warstwą kutikuli. Wątrobotrzustkę, która jest zredukowanym jelitem środkowym (*mesenteron*), tworzą cztery ślepo zakończone cewki otwierające się do bardzo krótkiego jelita przedniego [HOLDICH i RATCLIFFE, 1970].

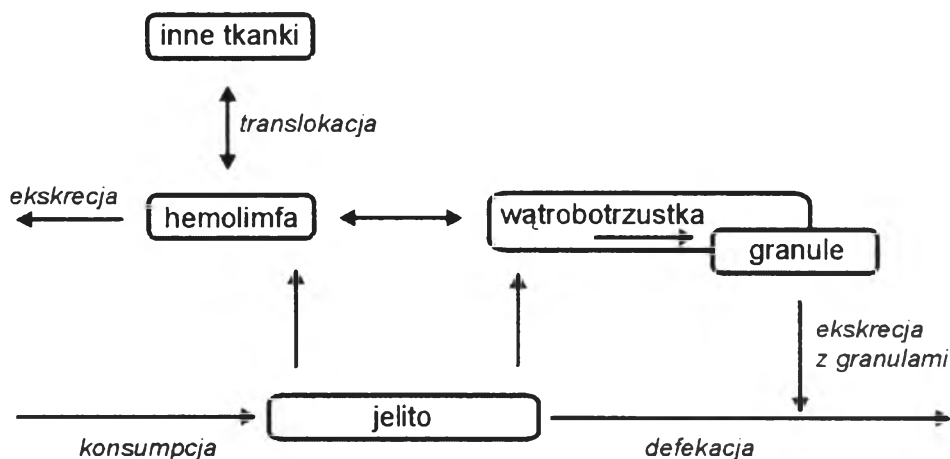


RYS. 1. Schemat budowy przewodu pokarmowego i wątrobotrzustki *P. scaber*.

1 – jelito przednie (*stomodeum*), 2 – typhlosole, 3 – komora przednia jelita tylnego, 4 – region brodawkowaty jelita tylnego, 5 – *rectum*, 6 – wątrobotrzustka (Rys. MAŁGORZATA SCHEIKI).

Wątrobotrzustka zbudowana jest z dwóch typów komórek. Komórki typu B produkują enzymy trawienne i zachodzi w nich trawienie wewnątrzkomórkowe. Duża liczba komórek tego typu ulega degradacji w trwającym 24 h cyklu. Komórki typu S nie podlegające tak częstym wymianom funkcjonują głównie jako miejsca składowania metali [HOPKIN, 1989]. Jelito tylne jest prostą rurą, w której przebiegu można wyróżnić: komorę przednią z parzystymi kanałami na grzbietowej powierzchni (*typhlosole*), pośredni region brodawkowaty, który kończy się zwieraczem oraz *rectum* (Rys. 1). Jelito tylne jest miejscem bytowania różnych mikroorganizmów [BIGNELL, 1984].

Jak już wspomniano powyżej, pierwotnym miejscem składowania metali u *P. scaber* jest wątrobotrzustka, w której gromadzi się więcej metali ciężkich niż w jakiegokolwiek miękkiej tkance innych zwierząt, metale mogą bowiem stanowić do 3% suchej masy tego narządu [HOPKIN i MARTIN, 1982; HOPKIN i wsp., 1986]. Są one składowane w wewnątrzkomórkowych granulach wątrobotrzustki należących do systemu lizosomalnego [WIESER i KLIMA, 1969; HOPKIN i MARTIN, 1984; PROSI i DALLINGER, 1988]. DONKER [1992] założyła, że tolerancja na metale u *P. scaber* nie opiera się na zwiększonej efektywności usuwania metali, ale na nasileniu ich unieczynniania.



Rys. 2. Możliwe szlaki poboru i usuwania metali u prosioka *P. scaber* (za: DONKER, 1992, zmieniono)

Badania opisujące ten sposób unieszkodliwiania metali doczekały się już szerszych opracowań monograficznych [BROWN, 1982; TAYLOR i SIMKISS, 1990].

Badania histochemiczne wątrobotrzustki *P. scaber* [PROSI i DALLINGER, 1988] pokazały, że w strukturach należących do systemu lizosomalnego odkłada się ołów, miedź, cynk i kadm, a ponadto znaczna część ołowiu, miedzi i kadmu pojawia się w małych strukturach znajdujących się na zewnątrz ograniczonych błonami organeli. HOPKIN [1989] podaje, że w taki sposób mogą być również magazynowane jony niklu, brak jednak było do tej pory szczegółowych badań na ten temat.

Nikiel jako pierwiastek niezbędny i toksyczny

Nikiel jest ważnym pierwiastkiem śladowym, niezbędnym do normalnego rozwoju wielu gatunków mikroorganizmów, roślin i niektórych kręgowców [EISLER, 2000]. Pierwiastek ten występuje w biosferze powszechnie. Wprowadzony do środowiska ze źródeł naturalnych, bądź sztucznie, na skutek działalności człowieka, krąży podlegając wielu procesom fizycznym i chemicznym, przenikając także do organizmów roślin i zwierząt [SEVIN, 1980; WHO, 1991]. Naturalne występowanie niklu ograniczone jest do terenów bogatych w pentlandyt ($(\text{FeNi})_9\text{S}_8$) – rudę niklu z domieszką kobaltu. Dotyczy to obszarów na terenie Kanady, Południowej Afryki, Rosji, Finlandii i Australii [USPHS, 1993]. Lokalne zanieczyszczenie środowiska niklem zdarza się przy wydobywaniu i wytopie rud tego metalu, spalaniu kopalin, działalności przemysłowej (niklowanie, tworzenie stopów, produkcja baterii). Źródłem skażenia są również odpady stałe (żużle) i ścieki [CAIN i PAFFORD, 1981; CHAU i KULIKOVSKY-CORDEIRO, 1995].

Biodostępność niklu, a w konsekwencji jego toksyczność, jest zależna zarówno od czynników abiotycznych (w szczególności od pH) jak i biotycznych [MORGAN i in., 2005]. Za toksyczny efekt działania związków zawierających nikiel odpowiedzialny jest jon Ni^{2+} . Negatywne skutki działania związków niklu są związane z powstającymi pod jego wpływem tlenowymi uszkodzeniami DNA i białek oraz hamowaniem komórkowej obrony antyoksydacyjnej [RODRIGUEZ i in., 1996]. W komórkach ssaków nikiel akumuluje się w jądrze komórkowym i jąderku, łącząc się tam z białkami, jądrowym RNA i wreszcie samym DNA. Uszkadza w ten sposób materiał genetyczny powodując zerwania nici i inne aberracje chromosomowe, a także zakłóca metabolizm DNA obniżając syntezę RNA i aktywność mitotyczną oraz ekspresję genów [USEPA, 1980; SUNDERMAN i in., 1984; KASPRZAK, 1987]. Przyłączanie się niklu do DNA jest hamowane przez sole wapnia, miedzi, magnezu manganu i cynku [WHO, 1991]. Obecność cynku obniża toksyczność niklu, prawdopodobnie poprzez konkutowanie z niklem o miejsca wiązania się z DNA i białkami [USEPA, 1985; WHO, 1991; USPHS, 1993; HARTWIG i in. 1994; EISLER, 2000]. Miejsca zawierające cynk w białkach regulujących transkrypcję (tzw. palce cynkowe) są często celem ataku metali. Tak jest też w przypadku niklu, którego jony mogą wypierać z nich cynk. Taka substytucja może zakłócać indukowaną niklem ekspresję genów, poprzez włączanie się tego pierwiastka w reakcje wolnorodnikowe. Może to zaowocować zerwaniem nici, formowaniem połączeń DNA-białka i zaburzeniami mitozy [WHO, 1991].

Nikiel do organizmów ludzi i zwierząt może przedostawać się drogą pokarmową, drogami oddechowymi oraz poprzez powłoki ciała [WHO, 1991]. Wiele gatunków zwierząt wypracowało mechanizmy kontrolowania i regulowania stężeń niklu przenikającego do ich ciał. Potwierdzają to szczegółowe badania prowadzone na stoncy *Chrysolina pardalina* (Chrysomelidae), której cały cykl życiowy związany jest z hyperakumulatorem niklu z rodziny Asteraceae – *Berkheya coddii* [AUGUSTYNIAK i in., 2002]. Z własnych obserwacji (dane niepublikowane) wiadomo, że ekosystemy o wysokich stężeniach Ni w podłożu (gleby serpentinitowe, Agnes Mine, RPA) są mało atrakcyjne dla Isopoda, gdyż zwierzęta te występują tam nieliczne. Niewiele jest również danych na temat stężeń niklu u lądowych bezkręgowców żyjących poza terenami naturalnego występowania tego pierwiastka.

Ponieważ kutikula *P. scaber* zbudowana jest z chityny wzmocnionej solami wapnia, przedostawanie się metali do jego organizmu będzie się odbywać głównie z przyjmowanym pokarmem, a kontakt z powierzchnią ciała będzie miał niewielkie znaczenie. Rozmieszczenie niklu w tkankach tego zwierzęcia może zmieniać się zależnie od tempa bioakumulacji, a to będzie bezpośrednio zależeć od ilości metalu pobranej z pokarmem. Nasuwają się więc pytania: jak upakowywany jest Ni w tkankach mających bezpośredni kontakt z tym metalem przyjmowanym wraz z pokarmem a więc w przewodzie pokarmowym i wątrobotrzustce? Czy odkładanie to będzie selektywne w wybranych partiach narządu, czy też rozmieszczenie będzie miało charakter losowy? Czy wysokie stężenie niklu w tych tkankach pozostanie bez

wpływu na stężenie innych metalicznych pierwiastków biogennych? Wykonanie analizy rozmieszczenia oraz badania stężenia niklu i innych pierwiastków w wątrobotrzustce i przewodzie pokarmowym (w tym makro- i mikroelementów) powinno dać odpowiedź na temat miejsca i sposobu unieszkodliwiania niklu oraz wzajemnych relacji pomiędzy różnymi pierwiastkami w warunkach ekspozycji *P. scaber* na nikiel w pokarmie. Kolejne pytania to: czy odłożony w tkankach nikiel powoduje ich uszkodzenia? Czy *P. scaber* potrafi jedynie biernie reagować na przenikający do jego organizmu nikiel upakowując go w wybranych kompartmentach tkanek narażonych na działanie tego metalu? A może aktywnie przeciwdziała takiemu stresowi uruchamiając precyzyjne systemy obronne?

Aby dokonać takiej analizy zaplanowano doświadczenie, w którym poddano zwierzęta chronicznej ekspozycji na nikiel w pokarmie. Hodowlę macierzystą zapoczątkowały osobniki obu płci o długości ciała 10-15 mm i średniej masie około 50 mg zebrane na Jurze Krakowsko-Częstochowskiej (okolice Myszkowa). Zwierzęta te hodowano w klimatyzowanych komorach, w kontrolowanych warunkach temperatury ($18 \pm 2^\circ\text{C}$) i fotoperiodu (cykl dobowy: 16L : 8D) [HOPKIN, 1990]. Zwierzęta przebywały w plastikowych terrariach wyłożonym warstwą gipsu ułatwiającą utrzymywanie stałej wilgotności [ODENDAAL i REINECKE, 1999]. Pokarm stanowiły jesienne (zebrane po opadnięciu w tym samym terenie co zwierzęta), wysuszone i pocięte na drobne fragmenty liście klonu (*Acer platanoides* L.). Po dwutygodniowym okresie aklimacji zwierząt do warunków laboratoryjnych rozpoczęto doświadczenie 24-tygodniowej ekspozycji *P. scaber* na nikiel. Przez ten okres zwierzęta otrzymywały pokarm o zróżnicowanym stężeniu Ni. W tym celu z hodowli macierzystej wybrano dorosłe osobniki obu płci. Zwierzęta podzielono na 4 grupy doświadczalne: K, Ni 1, Ni 2 i Ni 3. Osobniki *P. scaber* z każdej z grup doświadczalnych karmiono odpowiednio przygotowanymi liśćmi *A. platanoides*: moczonymi przez 24 h w wodzie destylowanej (kontrola) i roztworach chlorku niklu o następujących stężeniach tego metalu: 10, 100 i 1000 $\text{mg Ni} \cdot \text{l}^{-1}$. Metal obecny w roztworze przechodził w znacznym procencie do liści, co dało rzeczywiste stężenia niklu w tak przygotowanym pokarmie rzędu: 0,1 (kontrola), 8,0 (Ni 1), 75 (Ni 2) i 270 (Ni 3) $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ suchej masy. Pokarm dostarczano bez ograniczeń. Co 4 tygodnie dietę wzbogacano niewielką ilością rozdrobnionej w mózdzierzu suchej karmy dla psów, zabezpieczając im w ten sposób dodatkowe źródło niezbędnych aminokwasów [DONKER i BOGERT, 1991].

W następnych podrozdziałach zostaną omówione wybrane wskaźniki stresu chemicznego (wywołanego nadmiarem niklu w pokarmie), które zastosowano jako biomarkery w odniesieniu do działania tego metalu na prosionka – *P. scaber*.

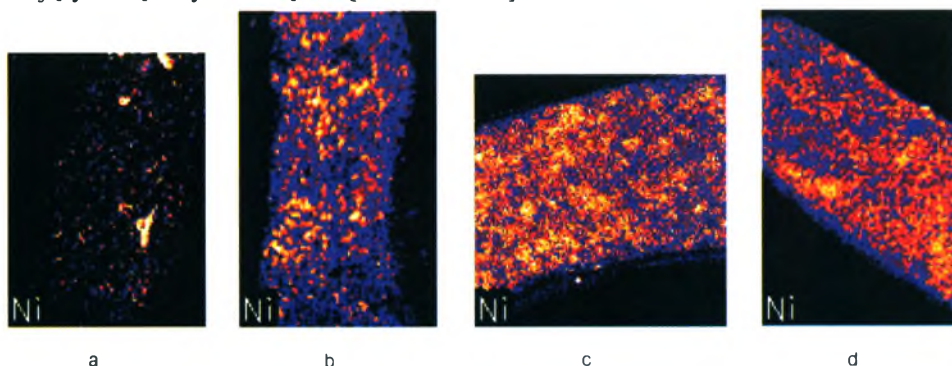
Akumulacja i rozmieszczenie wybranych pierwiastków w przewodzie pokarmowym i wątrobotrzustce *P. scaber*

Pośrednie z zastosowanych w pokarmie stężeń Ni (grupa Ni 2) spowodowało, że jego stężenie w przewodzie pokarmowym było bardzo wysokie i sięgało prawie połowy zawartości Ni w diecie. Można więc wnioskować o możliwościach stonóg do regulacji nadmiaru Ni. Zgodnie z klasyfikacją zaproponowaną przez DALLINGERA i RAINBOWA (1993) *P. scaber* można zaliczyć do tzw. regulatorów względem niklu. Także w tej grupie stwierdzono najwyższe wartości stężenia dla takich pierwiastków jak wapń, mangan, żelazo, brom i stront. Jednocześnie niższe były stężenia pierwiastków będących między innymi składnikami cytoplazmy takich jak chlor i potas; najwięcej chloru było u stonóg z grupy K, najmniej u stonóg z grupy Ni 3. Podobne zależności dotyczyły stężeń potasu. Malejące stężenia Cl i K stwierdzone w kolejnych grupach doświadczalnych ($K > Ni\ 1 > Ni\ 2 > Ni\ 3$) potwierdzają przypuszczenie, że to nadmiar Ni ma wpływ na transport i rozmieszczenie tych jonów w tkankach.

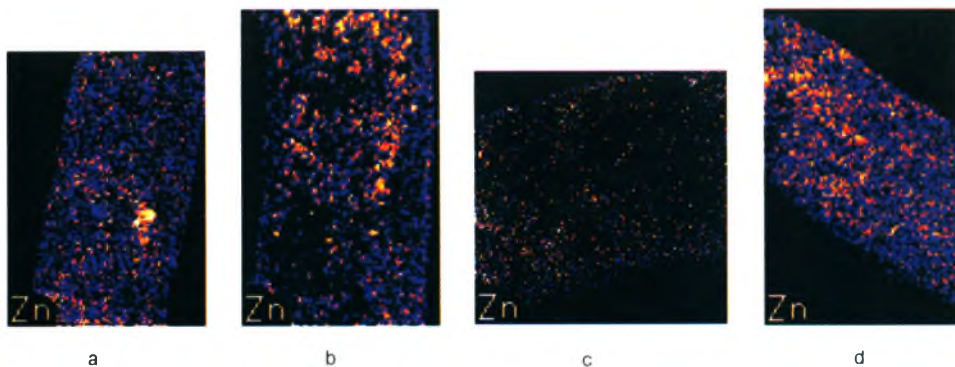
Rozmieszczenie makroelementów: chloru, potasu i wapnia w przewodzie pokarmowym było podobne. We wszystkich grupach doświadczalnych obszary występowania Cl i K częściowo pokrywały się, obejmując głównie części peryferyjne tego narządu. Wapń rozkładał się bardziej równomiernie i występował na całym obszarze skanowanych regionów, z pominięciem brzegów tkanek. Równomierne rozmieszczenie wapnia można tłumaczyć funkcją transportującą nabłonka przewodu pokarmowego *P. scaber*. Prawidłowa gospodarka Ca^{2+} jest dla tego gatunku bardzo ważna, między innymi ze względu na budowę okrywy ciała inkrustowanych tym pierwiastkiem [HOPKIN i MARTIN, 1984; HOPKIN, 1989; DONKER, 1992]. Rozmieszczenie miedzi i cynku w obrębie przewodu pokarmowego pokrywało się. W przypadku cynku jego stężenie pozostawało w odwrotnej zależności do wzrastającego stężenia niklu w diecie *P. scaber* i malało wraz z pobieraniem pokarmu zawierającego wzrastające stężenie niklu (Rys. 3a-d, 4a-d). Wskazuje to na słuszność wcześniejszych przypuszczeń, że jony niklu mogą wypierać cynk z białek regulujących procesy transkrypcji (z tzw. palcy cynkowych), co w konsekwencji może zakłócać ekspresję różnych genów [EISLER, 2000].

Stężenie niklu w wątrobotrzustce *P. scaber* było niższe aniżeli w przewodzie pokarmowym, lecz wzrastało w kolejnych grupach doświadczalnych proporcjonalnie do stężenia Ni w diecie tych zwierząt. Rozmieszczenie Ni w analizowanych fragmentach wątrobotrzustki było równomierne i podobne u stonóg z różnych grup doświadczalnych (Rys. 5a-d) choć na mapie rozmieszczenia tego pierwiastka reprezentatywnej dla stonóg z grupy Ni 3 (Rys. 5d) punkty odpowiadające maksymalnym wartościom stężeń (kolor biały) występują w większych skupieniach. Są to miejsca, które zapewne odpowiadają strukturom granularnym charakterystycznym dla komórek wątrobotrzustki osobników grupy Ni 3, a wykazanim na zdjęciach z mikroskopu elektronowego

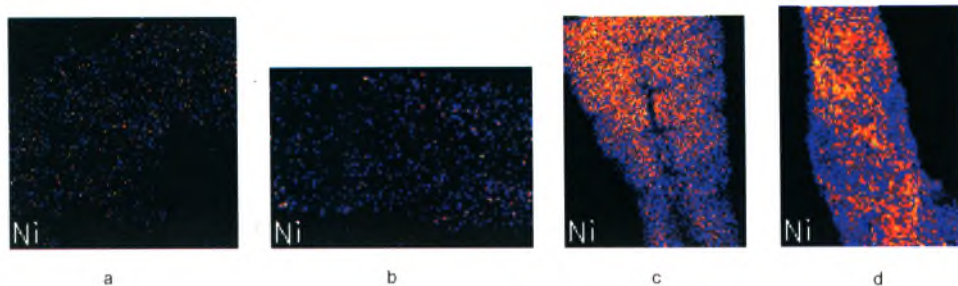
(dyskutowane w kolejnym podrozdziale). Podobne struktury stwierdzono także w analizie ultrastruktury komórek wątrobotrzuski *P. scaber* poddanych działaniu kadmu [KÖHLER i in., 1996a]. Oprócz niklu najwyższe wartości stężeń w grupie Ni 3 stwierdzono dla chloru i wapnia. Mimo że wraz ze wzrostem stężenia niklu w diecie grup doświadczalnych (Ni 1, Ni 2 i Ni 3) stężenie Zn malało, to jednak utrzymywało się na poziomie wyższym aniżeli w grupie kontrolnej. Najwyższe było w wątrobotrzusce osobników z grupy Ni 1, lecz także u stonóg z grup Ni 2 i Ni 3 było blisko 4- i 2-krotnie wyższe od kontroli. Świadczy to o tym, że wypieranie cynku przez nikiel jest zdecydowanie słabsze, zaś podwyższone stężenie pierwszego z wymienionych pierwiastków wskazuje na intensyfikację reakcji obronnych dokonujących się w tym narządzie [CHANG, 1996].



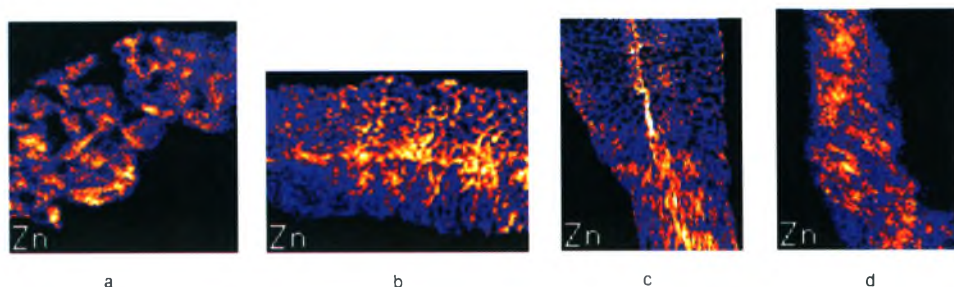
RYS. 3. Mapy rozmieszczenia niklu w wybranym obszarze przewodu pokarmowego *P. scaber* (a – grupa K, kontrola; b – grupa Ni 1; c – grupa Ni 2; d – grupa Ni 3).



RYS. 4. Mapy rozmieszczenia cynku w wybranym obszarze przewodu pokarmowego *P. scaber*; (a – grupa K, kontrola; b – grupa Ni 1; c – grupa Ni 2; d – grupa Ni 3).



RYS. 5. Mapy rozmieszczenia niklu w wybranym obszarze wątrobotrzustki *P. scaber* (a – grupa K, kontrola; b – grupa Ni 1; c – grupa Ni 2; d – grupa Ni 3).



RYS. 6. Mapy rozmieszczenia cynku w wybranym obszarze wątrobotrzustki *P. scaber* (a – grupa K, kontrola; b – grupa Ni 1; c – grupa Ni 2; d – grupa Ni 3).

Rozmieszczenie Cl, Ca oraz K na badanych obszarach wątrobotrzustki było równomierne we wszystkich grupach i częściowo pokrywało się ze sobą. Zupełnie inaczej wyglądał rozkład Cu i Zn w wątrobotrzustce. Pierwiastki te znajdowały się głównie na granicy pomiędzy członami budującymi pojedyncze naczynie, co szczególnie dobrze uwidaczniają mapy wykonane dla stonogi z grupy Ni 2 (Rys. 6c).

Zmiany w ultrastrukturze komórek przewodu pokarmowego i wątrobotrzustki *P. scaber*

Dla skorupiaków zaproponowano dwa możliwe mechanizmy unieczynniania metali: kompleksowanie poprzez białka je wiążące – metalotioneiny [WEBB i CAIN, 1982; WHITE i RAINBOW, 1986; WONG i RAINBOW, 1986] oraz przechowywanie w granulach [WIESER, 1968; PROSI i in., 1983; PROSI i DALLINGER, 1988]. Cechą wspólną obu strategii jest zapobieganie uszkodzeniom organelli komórkowych poprzez wiązanie nadmiaru metali. W wątrobotrzustce *P. scaber* funkcjonują prawdopodobnie obydwa te powiązane ze sobą mechanizmy: indukcja wiążących metal białek oraz wewnątrzkomórkowe odosobnienie unieczynnionych metali w granulach. Drugi z mechanizmów unieczynniania metali – powstawanie zawierających metale granul, ma miejsce u wielu bezkręgowców [LUDWIG i ALBERTI, 1988]. Badania opisujące ten sposób

unieszkodliwiania metali doczekały się już szerszych opracowań monograficznych [BROWN, 1982; TAYLOR i SIMKISS, 1990]. Omówiono w nich dokładnie skład i strukturę tych granul, jednak nie wyjaśniono do końca ich funkcji. HOPKIN i MARTIN [1982] stwierdzili że wątrobotrzustka Isopoda z terenów zanieczyszczonych metalami, zawiera więcej tych struktur niż u osobników z terenu referencyjnego. Sugeruje to, że granule powstały jako twory służące do przechowywania metali aż do czasu ich utylizacji. W 1984 autorzy Ci wycofali się z tej tezy i stwierdzili, że raz zdeponowane w granulach metale pozostają tam aż do śmierci danego osobnika.

HOPKIN [1989] podał klasyfikację granul w zależności od ich składu i sposobu powstawania, wyróżniając cztery ich typy:

- granule typu A, zbudowane z koncentrycznych warstw fosforanów wapnia i magnezu, mogące gromadzić także mangan i cynk;
- granule typu B, zawierające duże ilości siarki wiążącej takie metale jak kadm, miedź i cynk, a także ołów i żelazo;
- granule typu C, złożone prawie wyłącznie z żelaza pochodzącego z rozpadu ferrytyny;
- granule typu D, powstające jedynie zewnątrzkomórkowo, dużo większe od trzech pierwszych, zawierające prawie wyłącznie wapń w postaci węglanów.

Spośród wymienionych typów granul najistotniejsze w detoksykacji nieenzymatycznej wydają się być granule typu B.

W prezentowanych badaniach podjęto się oszacowania jakie zmiany zachodzą w ultrastrukturze komórek wątrobotrzustki i przewodu pokarmowego *P. scaber* pod wpływem niklu, a także jaki jest udział tych narządów w bioakumulacji tego pierwiastka. Analizę zaobserwowanych zmian ultrastruktury komórek przewodu pokarmowego i wątrobotrzustki, powstałych pod wpływem ekspozycji na nikiel w pokarmie, wykonano w oparciu o obrazy uzyskane techniką transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM).

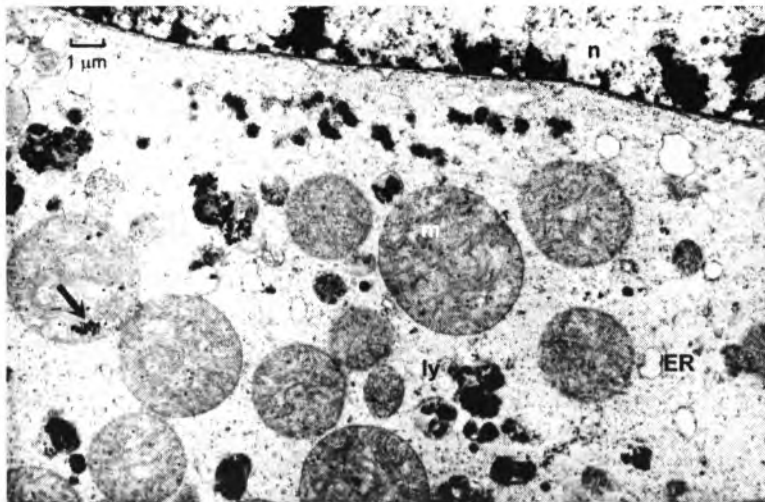
W porównaniu z obrazem przewodu pokarmowego osobników z grupy kontrolnej, elektronogramy przewodu pokarmowego stonóg z wszystkich pozostałych grup doświadczalnych pokazują różnorodne zaburzenia w budowie bazalnego¹ i apikalnego² labiryntu błon i pojawienie się w cytoplazmie wypełnionych elektronowo gęstą zawartością lizosomów (ly), najliczniej reprezentowanych w komórkach stonóg z grupy Ni 3 (Fot. 1). Ponadto, w komórkach zwierząt z grup Ni 1 i Ni 3 obecne są duże mitochondria, z wyraźnie zaznaczającymi się ziarnistościami w ich wnętrzu (Fot. 1).

W porównaniu do obrazów kontrolnych, na elektronogramach wątrobotrzustki osobników z grup niklowych obserwuje się retikulum szorstkie (rER) w postaci drobnych pęcherzyków, pojawiają się liczne struktury pseudomielinowe (mls),

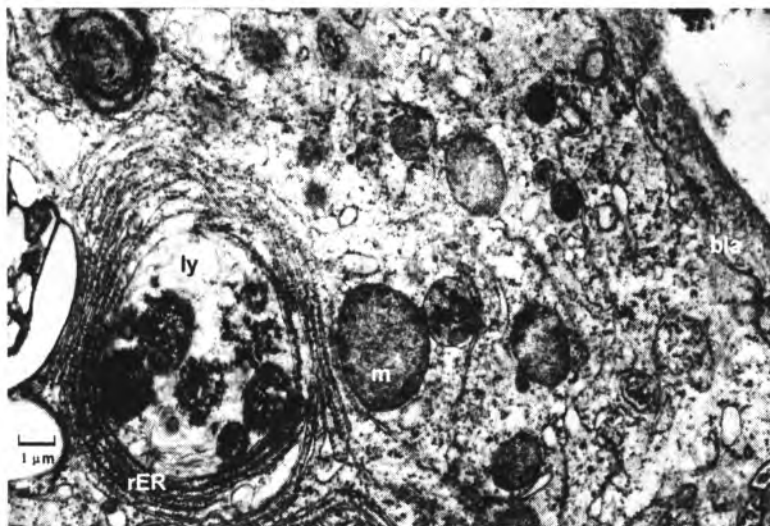
¹ Bazalny – dolny (przyp. red.).

² Apikalny – górny (przyp. red.).

stwierdza się ponadto cytoplazmatyczne granule (g), które są lizosomami wtórnymi zawierającymi upakowany, elektronowo gęsty materiał.



FOT. 1. Przewód pokarmowy *P. scaber*. Grupa Ni 3, fragment wnętrza komórki. Objasnienia: → – ziarnistości we wnętrzu mitochondrium, ly – lizosom, m – mitochondrium, n – jądro komórkowe, ER – retikulum endoplazmatyczne gładkie (Fot. M. TARNAWSKA).



FOT. 2. Fragment wątrobotrzustki *P. scaber*. Grupa Ni 3, część bazalna komórki (od strony hemocelu). Objasnienia: bla – blaszka podstawna, ly – lizosom, m – mitochondrium, rER – retikulum endoplazmatyczne szorstkie (Fot. M. TARNAWSKA).

W ultrastrukturze komórek wątrobotrzustki zwierząt z grupy Ni 3 stwierdzono najliczniejsze zmiany w stosunku do kontroli. Na terenie cytoplazmy tych komórek pojawiły się struktury granularne (g) (Fot. 2). Mitochondria są „napęczniałe”, o zaburzonym układzie grzebieni, obecne są także duże struktury koncentrycznie ułożonego retikulum szorstkiego (rER), otaczające lizosomy o charakterze wtórnym (Fot. 2).

Oddziaływanie niklu na komórki przypomina inne pierwiastki obecne w stężeniach wywołujących efekty toksyczne. Podobne zmiany opisano w komórkach tego narządu *P. scaber* powstałe pod wpływem innych metali, takich jak Cd, Pb i Zn [KÖHLER i in., 1996a; ODENDAAL i REINECKE, 2003; ŽNIDARŠIČ i in., 2003]. Autorzy pierwszej z cytowanych prac sugerują, że najwyższe z zastosowanych w tej pracy stężeń metali, niekorzystnie wpływały na stan błony komórkowej części apikalnej komórek nabłonka wątrobotrzustki, co mogło powodować obniżenie tempa wchłaniania składników odżywczych. Nakładając się ze wzrostem procesów unieczynniania metali mogło to prowadzić do ogólnego niedoboru energii, obserwowanego w wątrobotrzustce, jak np. jako zmniejszenie liczby kropli tłuszczu. KÖHLER i współpracownicy [1996a] wnioskowali aby zaobserwowane skutki używać jako biomarkery niekorzystnego wpływu metali ciężkich. Także w tych badaniach wykazano, że metale wpływały na zmiany w ultrastrukturze komórek wątrobotrzustki, a ich nasilenie wskazywało na zależność od stężenia metali. Niskie stężenia metali powodowały zmiany tylko w obrębie organelli komórkowych, zaś wyższe prowadziły do patologicznych zmian na poziomie całych komórek. W przypadku badań przeprowadzonych w ramach mojej pracy obserwowano analogiczne zmiany w ultrastrukturze komórek wątrobotrzustki *P. scaber* u osobników ekspozowanych na nikiel podobne do tych powstałych pod wpływem innych metali. Struktury granularne pojawiły się tylko w komórkach osobników z grup „niklowych”. Wyższe stężenia niklu powodowały zmiany na poziomie organelli (co szczególnie zaznaczało się w zaburzeniach budowy mitochondriów i retikulum szorstkiego) oraz całych komórek.

Zmiany w komórkach nabłonka przewodu pokarmowego i wątrobotrzustki *P. scaber* powstałe pod wpływem niklu są różnego typu. KORSLOOT i współpracownicy [2004] zaproponowali trzystopniowy podział uszkodzeń powstających w komórkach w zależności od rodzaju stresora i czasu ekspozycji. Uwzględniając ich wzrost ilościowy oraz charakter uszkodzeń od nieistotnych do determinujących żywotność, wyróżniają oni następujące poziomy uszkodzeń:

1. uszkodzenia które mogą być naprawione przez komórkowe systemy obronne, z możliwością przywrócenia homeostazy komórkowej;
2. pośredni poziom uszkodzeń, kiedy komórka, pozostając przy życiu, jest zdolna do naprawy tylko niektórych uszkodzeń i częściowego przywrócenia homeostazy;
3. wysoki poziom uszkodzeń, których komórki nie mogą już naprawić. Podstawowe procesy komórkowe są zahamowane, a ich organella komórkowe tracą swoją

integralność. Komórka rozpoczyna proces apoptozy lub obumierania na drodze nekrozy.

Na przedstawiony podział uszkodzeń jakie mogą powstawać w komórce nakłada się trzystopniowy podział skutków pozostających w ścisłej zależności od czasu trwania narażenia na czynnik stresowy. Na tej podstawie można wyróżnić 3 poziomy skutków:

- pierwszego stopnia: uszkodzenia powstających białek, denaturacja białek enzymatycznych i strukturalnych, zmiany w wiązaniach kowalencyjnych centrów aktywnych enzymów, utlenianie lipidów i nukleotydów;
- drugiego stopnia: uszkodzenia struktur (błon, DNA, cytoszkieletu) i wpływ na takie procesy komórkowe jak oddychanie i produkcja energii;
- trzeciego stopnia: odpowiadające konsekwencjom uszkodzeń określonych struktur i wpływu na procesy metaboliczne, doprowadzające do obniżenia lub całkowitej utraty integralności struktur i zahamowania metabolizmu komórkowego [KORSLOOT i in., 2004].

W świetle tak przyjętego podziału zmiany zachodzące w komórkach nabłonka przewodu pokarmowego i wątrobotrzustki *P. scaber* pod wpływem niklu można więc zaliczyć do różnych kategorii uszkodzeń. Zastosowana w badaniach technika transmisyjnej mikroskopii elektronowej pozwala na obserwacje uszkodzeń na poziomie organelli komórkowych i całych komórek. Zmiany w obrębie przewodu pokarmowego spowodowane ekspozycją na metal jak: zaburzenia budowy labiryntu błon w części apikalnej i bazalnej komórek oraz dezintegracja błon mitochondrialnych obrazują uszkodzenia odpowiadające skutkom drugiego stopnia. Przypuszczalnie uszkodzenia tych struktur miały również znaczący wpływ na kondycję osobników z grup „niklowych”, gdyż świadczą o tym, że musiały nastąpić zaburzenia systemu błon wewnątrzkomórkowych transportu jonów i wody, zaś zniekształcenia mitochondriów wpływałyby na dysfunkcje metabolizmu tlenowego. Często pojawiające się w komórkach wątrobotrzustki osobników z grupy Ni 3 otoczone retikulum szorstkim lizosomy mogą świadczyć o wysokim poziomie uszkodzeń w obrębie tego narządu powodowanym przez nikiel, gdyż są one jednym z ważniejszych symptomów zachodzącego procesu apoptozy.

Komórki zwierząt w warunkach stresu

W warunkach stresowych organizmy eukariotyczne mogą uruchamiać sprawne mechanizmy obronne. W przypadku bezkręgowców lądowych, podobnie jak u innych grup zwierząt, można wyróżnić pięć podstawowych systemów odpowiedzi na stres.

Są to: białka stresu, system obrony antyoksydacyjnej, metalotioneiny, oksygenazy (cytochrom P-450) i aktywowany stresem system z udziałem kinaz białkowych [KORSLOOT i in., 2004]. W normalnych warunkach systemy te włączone są w prawidłowy przebieg rozwoju i utrzymanie komórkowej homeostazy. Białka stresu odpowie-

działne są za poprawne fałdowanie i wewnątrzkomórkowy transport powstających białek. Składniki systemu odpowiedzi na stres oksydacyjny uczestniczą w usuwaniu wolnych rodników tlenowych powstających podczas wewnątrzkomórkowego oddychania i innych procesów metabolicznych. Metalotioneiny biorą udział w komórkowej homeostazie metali niezbędnych komórce do prawidłowego funkcjonowania, a system oksygenaz jest włączony w biotransformację i sprzęganie hormonów, ich metabolitów oraz ksenobiotyków. W warunkach stresu, systemy te w powiązaniu z ich podstawowymi zadaniami spełniają również dodatkowe funkcje. Białka stresu chronią ważne z punktu widzenia funkcjonowania komórki inne białka, po to aby zachować komórkową integralność. Składniki systemu obrony antyoksydacyjnej eliminują wolne rodniki, utrzymując prawidłowy stan redox i inicjując naprawę uszkodzeń. Metalotioneiny uczestniczą w unieczynnianiu jonów metali ciężkich i w usuwaniu wolnych rodników. Niektóre enzymy systemu oksygenaz są aktywowane gdy ksenobiotyki (głównie związki hydrofobowe) wnikać do komórki powodują jej uszkodzenia. Bódcze stresowe są przekazywane przez podstawowy system sygnałowy do aparatu transkrypcyjnego w jądrze komórkowym, stając się częścią komórkowej obrony przed stresem. W ten sposób komórka używa pełnego zestawu systemów obronnych w odpowiedzi na stres środowiskowy [KORSLOOT i in., 2004].

Stres oksydacyjny

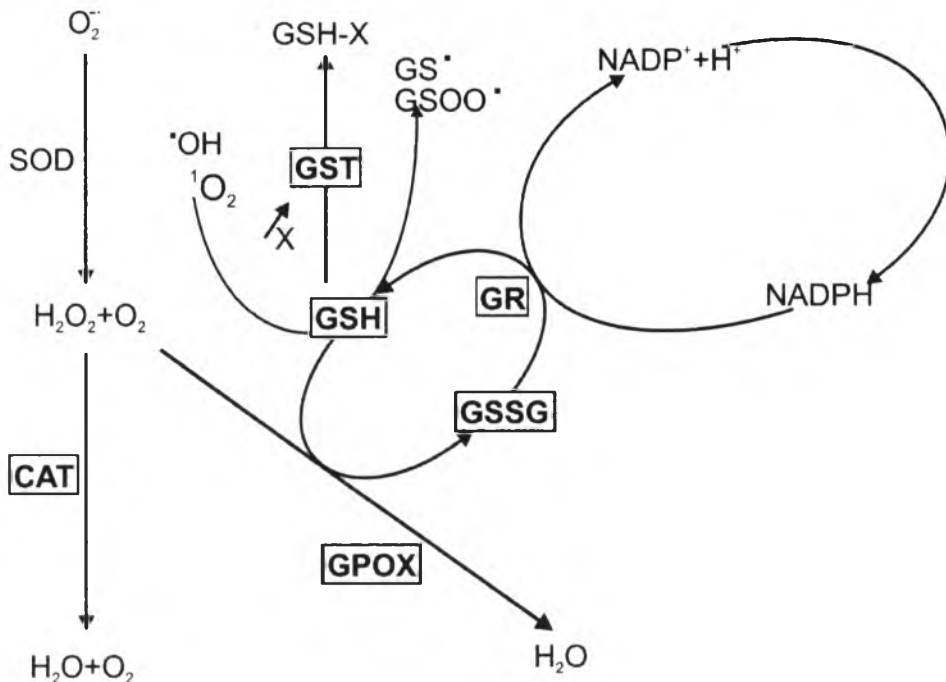
Stres oksydacyjny jest jednym z istotnych elementów stresu środowiskowego. Czynniki oksydacyjne mogą generować wolne rodniki tlenowe takie jak anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$), rodnik wodorotlenowy (OH^{\cdot}), tlenek azotu (NO^{\cdot}), nad-tlenek wodoru (H_2O_2) oraz tlen singletowy (1O_2). Wymienione reaktywne formy tlenu powstają w normalnych warunkach jako produkty pośrednie procesów redukcji tlenu, reakcji redox i podczas metabolizowania różnych związków chemicznych. W ciele organizmów poddanych stresowi środowiskowemu produkowana jest dodatkowa pula tych związków, co prowadzić może do przekroczenia progu toksycznego. Aby temu zapobiec, komórki muszą uruchamiać systemy obronne, w których uczestniczą:

- system enzymatyczny pozwalający na utrzymywanie reaktywnych form tlenu (RFT) na poziomie nie zagrażającym organizmowi poprzez ich redukcję do H_2O ;
- nieenzymatyczne „zmiatacze” wolnych rodników [KORSLOOT i in., 2004].

Jednym z takich „zmiataczy” wolnych rodników – jest glutation (GSH). Jest to tripeptyd: γ -glutamyl-cysteino-glicyna, występujący powszechnie w komórkach eukariotycznych. Jest najczęściej występującym w komórce tiem³ o małej masie

³ Tiole – tioalkohole (dawniej merkaptan) to grupa związków organicznych, odpowiedników alkoholi, w których atom tlenu grupy hydroksylowej został zastąpiony atomem siarki. Zawierają grupę -SH, zwaną grupą tiolową (przyp. red.).

molekularnej. Reszta sulfhydrylowa⁴ cysteiny nadaje tej cząsteczce wysoki potencjał redukcyjny co sprawia, że zredukowany glutation odgrywa ważną rolę w wielu procesach detoksykacyjnych. GSH wchodzi w interakcje z wolnymi rodnikami i czynnikami utleniającymi, takimi jak H_2O_2 , $\text{O}_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} (Rys. 7) oraz produktami peroksydacji lipidów [YU, 1994; MEISTER, 1995].



RYS. 7. Schemat reakcji związanych z glutationem oraz z usuwaniem reaktywnych form tlenu (zmodyfikowane za: BARTOSZ [2003] oraz Ji i LEEUWENBURGH [1996]).

Objaśnienia: $\text{O}_2^{\bullet-}$ – anionorodnik nadadtlenkowy, H_2O_2 – nadtlenek wodoru, OH^{\bullet} – rodnik wodorotlenowy, $^1\text{O}_2$ – tlen singletowy, GS• – rodnik glutationylowy, GS•GS• – rodnik nadadtlenku glutationu, X – ksenobiotyki, SOD – dysmutaza nadadtlenkowa, CAT – katalaza, GST – S-transferaza glutationowa, GSH – glutation zredukowany, GSSG – glutation utleniony, GR – reduktaza glutationowa, GPOX – peroksydaza glutationowa. (Rys. MAŁGORZATA SCHEIKI).

W prawidłowych warunkach glutation występuje prawie wyłącznie w formie zredukowanej (GSH), znikoma część komórkowej puli glutationu stanowi utleniona postać tego związku (GSSG). GSH utrzymuje w postaci zredukowanej reszty sulfhydrylowe wielu białek w komórce, a także odgrywa ważną rolę w metabolizmie kwasów nukleinowych, poprzez redukcję rybonukleotydów do deoksyrybonukleotydów. GSH

⁴ Reszta sulfhydrylowa – grupa -SH, zwana grupą tiolową (przyp. red.).

bierze również udział w redukcji różnych antyoksydantów w komórce, w tym powstałych pod wpływem rodników nadtlenu lipidów utlenionych form witaminy C i E, umożliwiając im ponownie pełnienie funkcji antyoksydacyjnych [JI i LEEUWENBURGH, 1996]. Jak już wspomniano wcześniej, w reakcjach nieenzymatycznych glutation pełni w komórce rolę zmiataacza wolnych rodników:



Reakcje te prowadzą do odtworzenia wyjściowej struktury cząsteczki, z której powstał wolny rodnik. Powstały w tej reakcji rodnik glutationylowy (GS^{\bullet}) może dimeryzować:



lub w reakcji z tlenem tworzyć rodnik nadtlenu glutationu:



[JI i LEEUWENBURGH, 1996].

Dzięki obecności grupy tiolowej GSH bierze także udział w unieczynnianiu jonów metali ciężkich, tworząc z nimi kompleksy [VIARENGO i in., 1997].

Obecność niklu w pokarmie nie mogła więc pozostać bez wpływu na zawartość glutationu (GSH) w przewodzie pokarmowym i wątrobotrzustce *P. scaber*. Jego stężenie w przewodzie pokarmowym stonóg z grupy Ni 3 było najwyższe w porównaniu z innymi grupami. (Rys. 8). Może to świadczyć o tym, że glutation uczestniczy w tej tkance unieczynnianiu niklu i jego odkładaniu w granulach w postaci nieczynnej (związanej z GSH).

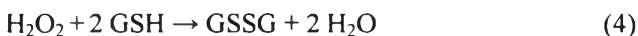
Zupełnie inaczej wygląda obraz stężenia glutationu w wątrobotrzustce stonóg z różnych grup doświadczalnych. Wykazano bowiem ujemną korelację pomiędzy stężeniem GSH a stężeniem niklu zakumulowanego w tym narządzie (Rys. 8). Może to świadczyć o tym, iż obecność niklu w pokarmie obniża ilość tego związku w wątrobotrzustce. Potwierdzeniem tego mogą być badania wykonane na innych przedstawicielach bezkręgowców, lecz z wykorzystaniem innych metali [BABCZYŃSKA i MIGULA, 2002].

Analiza stężeń glutationu pomiędzy narządami wykazała istotne statystycznie różnice jedynie dla zwierząt z grupy kontrolnej – w wątrobotrzustce stonóg z tej grupy stężenie glutationu było prawie 8 razy wyższe niż w przewodzie pokarmowym (Rys. 8).

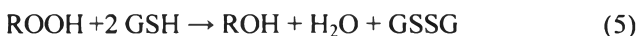
Jest to zapewne efekt szczególnej roli jaką pełni wątrobotrzustka w usuwaniu skutków działania wolnych rodników. Jeśli w wątrobotrzustce ilość tego związku maleje proporcjonalnie do narażenia na metal, może to świadczyć o zachodzących w tym narządzie nieenzymatycznych reakcjach sprzęgania oraz nasileniu reakcji usuwania wolnych rodników związanych z tym trójpeptydem [WILCZEK i in., 2004; AUGUSTYNIAK i in., 2005; WILCZEK, 2005].

Ponieważ wzrost stężenia niklu w pokarmie *Porcellio scaber* powinien prowadzić do nasilonych reakcji wolnorodnikowych, zaś pośrednie jego działanie mogło powodować ograniczenie sprawności katalitycznej enzymów, uczestniczących w procesach wolnorodnikowych, poziom aktywności tych enzymów w warunkach zmiennego obciążenia czynnikiem stresowym może być ważnym biomarkerem zarówno narażenia jak i skutków toksycznych powodowanych przez ten metal. Przeanalizowano zatem jak zmienia aktywność niektórych enzymów włączonych w system obrony antyoksydacyjnej.

Nadtlenek wodoru jest rozkładany do wody przez dwa systemy enzymatyczne: katalazę (CAT) i peroksydazę glutationową (GPOX) (Rys. 7). Drugi z enzymów katalizuje reakcję redukcji H_2O_2 i wodoronadtlenków organicznych (ROOH). GPOX uczestniczy w tej reakcji wykorzystując glutation (GSH) jako substrat:



lub:



[BARTOSZ, 2003].

Powstały w wyniku katalizowanych przez peroksydazę reakcji utleniony glutation (GSSG) jest bezużyteczny w komórce, a nagromadzony w większych stężeniach może być toksyczny. Dlatego jest on ponownie przekształcany w postać zredukowaną przy udziale reduktazy glutationowej (GR) (Rys. 7), dla której donorem elektronów jest NADPH^5 :



[ALLEN i SOHAL, 1986].

Reakcja ta pozwala na utrzymywanie w komórce stałego poziomu zredukowanego glutationu, aktywnego w procesach utleniania i redukcji.

Aktywność selenozależnej peroksydazy glutationowej (GPOX) mierzona względem nadtlenku wodoru w przewodzie pokarmowym *P. scaber* była najniższa u zwierząt z grupy kontrolnej, a stonogi z grup „niklowych” (Ni 1, Ni 2 i Ni 3) wykazywały aktywność odpowiednio 2-, blisko 4- i 6-krotnie wyższą (Rys. 9). W wątrobotrzustce najwyższą aktywność GPOX stwierdzono u osobników z grupy Ni 3, a najniższą, stanowiącą niespełna 10% wartości zmierzonej dla grupy Ni 3, w grupie kontrolnej. Aktywność GPOX w przewodzie pokarmowym i wątrobotrzustce wzrastała w kolejnych grupach doświadczalnych i nie stwierdzono żadnej istotnej statystycznie różnicy w aktywności tego enzymu w tych samych grupach między badanymi narządami (Rys. 9). W niniejszej pracy stwierdzono również istotną dodatnią korelację pomiędzy aktywnością peroksyda-

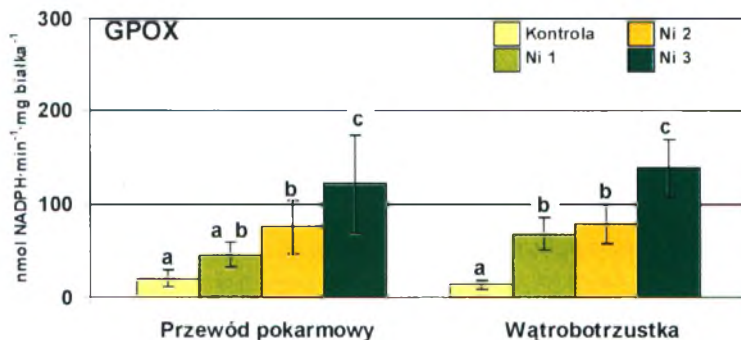
⁵ NADPH – zredukowana forma fosforanu dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (przyp. red.).

zy a stężeniem niklu w tkance zarówno w przewodzie pokarmowym jak i w wątrobotrzustce, a więc zależności te mogłyby potwierdzać prooksydacyjne działanie niklu.

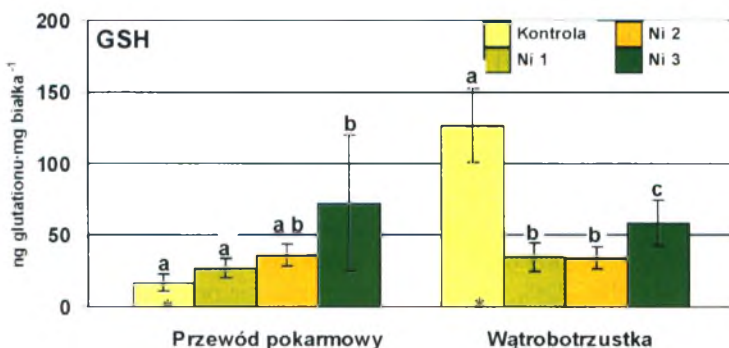
Wydaje się, że przy malejącym stężeniu GSH efektywność procesów sprzęgania powinna być bardzo wysoka, szczególnie u stonóg z grup Ni 2 i Ni 3, czemu towarzyszy zapewne szybkie powrotne przekształcanie glutationu w postać zredukowaną z udziałem reduktazy glutationowej [MIGULA i in., 2004; WILCZEK i in., 2004; WILCZEK, 2005]. Wskazuje na to wysoka aktywność reduktazy glutationowej (GR) w przewodzie pokarmowym *P. scaber* u stonóg z grupy Ni 3, tam była bowiem najwyższa i istotnie różniła się względem wszystkich pozostałych grup. Podobnie było w wątrobotrzustce, gdzie aktywność GR była najwyższa w grupie Ni 3, zaś najniższa w grupie kontrolnej (Rys. 10).

W niniejszej pracy analizowano aktywność różnych enzymów włączonych w komórkowy system usuwania reaktywnych form tlenu. Pełen obraz sprawności tego układu enzymów może dać ocena wzajemnych powiązań między nimi. Interesujące wyniki dała analiza korelacji pomiędzy aktywnością enzymów i stężeniem glutationu w obrębie narządów *P. scaber*. Dla przewodu pokarmowego pozwoliła stwierdzić, że stężenie GSH jest dodatnio skorelowane między innymi z aktywnością GPOX, czyli enzymu wykorzystującego ten związek. Wspomniano już wcześniej, że za przejście GSSG w GSH odpowiada reduktaza glutationowa (GR). W tych badaniach, aktywność GR była dodatnio skorelowana ze stężeniem glutationu i zapewniała odpowiedni poziom tego związku. Fakt ten potwierdza również dodatnia korelacja pomiędzy aktywnością GPOX i GR. Wraz z obciążeniem organizmu niklem wzrastało więc znaczenie szlaków metabolicznych związanych z glutationem. Dla wątrobotrzustki analiza zależności między aktywnością enzymów i stężeniem glutationu wykazała, że stężenie glutationu jest ujemnie skorelowane z aktywnością GPOX. Niskie stężenie glutationu w wątrobotrzustce stonóg z grupy Ni 3 może świadczyć o znaczącej roli procesów sprzęgania z GSH zachodzących u osobników z tej grupy, a więc związane jest ze zużyciem substratu tej reakcji jakim jest glutation. Dodatnia zależność pomiędzy GPOX i GR potwierdza współpracę obu enzymów również w tej tkance – aktywność GPOX jest przecież zależna od tempa odtwarzania zredukowanego glutationu przez reduktazę glutationową [PARDINI, 1995].

Brak w literaturze odpowiednich danych porównawczych odnoszących się do oddziaływań samego niklu na wzajemne relacje między enzymami analizowanymi w tej pracy. Istnieją jednak takie badania w odniesieniu do innych metali, a ich wyniki są zbieżne. Między innymi WILCZEK i współpracownicy [2004] stwierdzili istotną dodatnią korelację pomiędzy stężeniem GSH a aktywnością GPOX u samic pajaka lejkowca labiryntowego (*Agelena labyrinthica*). Tak więc są to procesy, które kompensując skutki toksyczności metali, przebiegają dość podobnie w odległych systematycznie grupach bezkręgowców, jednak ich nasilenie może się zasadniczo różnić.

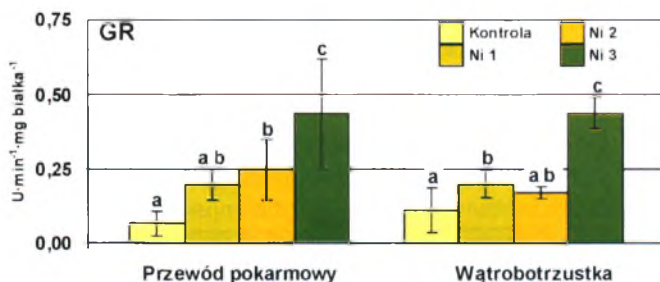


RYS. 8. Aktywność selenozależnej peroksydazy glutationowej (GPOX) mierzona względem nadtlenu wodoru (wartości średnie \pm odchylenie standardowe wyrażone w nmolach NADPH \cdot min $^{-1}$ \cdot mg białka $^{-1}$) w przewodzie pokarmowym i wątrobotrzustce *P. scaber* w grupach doświadczalnych ($n = 7$ dla każdej grupy i narządu). Te same litery oznaczają grupy homogenne w obrębie narządu przy $p < 0,05$).



RYS. 9. Stężenie glutationu [GSH] (wartości średnie \pm odchylenie standardowe wyrażone w ng glutationu całkowitego \cdot mg białka $^{-1}$) w przewodzie pokarmowym i wątrobotrzustce *P. scaber* w grupach doświadczalnych ($n = 7$ dla każdej grupy i narządu). Te same litery oznaczają grupy homogenne w obrębie narządu przy $p < 0,05$).

* – różnice istotne statystycznie w stężeniu GSH pomiędzy tymi samymi grupami z różnych narządów dla $p < 0,05$).



Rys. 10. Aktywność reduktazy glutationowej (GR) (wartości średnie \pm odchylenie standardowe wyrażone w $\text{U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg białka}^{-1}$) w przewodzie pokarmowym i wątrobrzuszce *P. scaber* w grupach doświadczalnych ($n = 7$ dla każdej grupy i narządu). Te same litery oznaczają grupy homogenne w obrębie narządu przy $p < 0,05$.

Białka stresu

W odpowiedzi na różnorodne czynniki stresowe, wszystkie komórki, zarówno prokariotyczne jak i eukariotyczne produkują specyficzne białka o różnej charakterystyce i funkcjach, dla których przyjęto ostatnio nazwę białka stresu. Do tej grupy białek zaliczamy białka szoku cieplnego (ang.: *heat shock proteins, hsp*), odkryte w gruczołach ślinowych muszki owocowej (*Drosophila*) w odpowiedzi na wysoką temperaturę [RITOSSA, 1962] a zidentyfikowane w 1974 przez TISSIERES i współpracowników. W oparciu o zróżnicowanie mas molekularnych tych białek wyróżnia się wśród nich następujące rodziny: hsp90 (79-98 kDa), hsp70 (66-78 kDa), hsp60 (55-65 kDa) i LMWs – rodzina hsp o małej masie molekularnej (13,5-39 kDa) [SANDERS, 1993]. Spośród wymienionych grup tych wysoce konserwatywnych białek rodzina hsp70 jest najliczniejsza i najlepiej zbadana. Białka stresu reprezentujące rodzinę hsp70 wykrywane są u wszystkich organizmów [LINDQUIST, 1986; SANDERS, 1993; BIERKENS, 2000]. Charakteryzują się one stałą ekspresją i w normalnych warunkach uczestniczą w powstawaniu właściwej struktury innych białek, transporcie prekursorów protein do organelli komórkowych takich jak mitochondria i retikulum endoplazmatyczne. Transportują również uszkodzone białka bądź ich agregaty do lizosomów, gdzie te ulegają degradacji [CHIANG i in., 1989; GETHING i SAMBROOK, 1992]. Uczestniczą przez to w różnych procesach metabolicznych oraz we wzroście i rozwoju komórek, a tym samym są niezbędne dla prawidłowego ich funkcjonowania [ASHBURNER, 1982; ELLIS i VAN DER VIES, 1991; WELCH, 1993; ELEFANT i PALTER, 1999].

Białka szoku cieplnego są syntetyzowane w komórkach również pod wpływem szeregu czynników szkodliwych takich jak: wysoka i niska temperatura, jony metali w stężeniach toksycznych i wielu innych [NOVER, 1991; PYZA i in., 1997]. Bezpośrednim czynnikiem powodującym indukcję tej grupy białek może być pojawienie się w komórce zdenaturowanych lub uszkodzonych białek [WELCH, 1993]. Reakcja ta jest

często bardzo szybko. Niektóre białka stresu pojawiają się już w ciągu kilku minut od zadziałania czynnika indukującego ich produkcję, osiągając wysokie stężenia po godzinie [LINDQUIST, 1986].

W warunkach stresu hsp chronią najważniejsze białka komórkowe przed denaturacją, pomagają w naprawie uszkodzeń i podobnie jak w normalnych warunkach uczestniczą w degradacji nieprawidłowo zbudowanych białek [SANDERS, 1990]. Dodatkowo, prawdopodobnie włączają się w mechanizm regulacji odpowiedzi na stres poprzez oddziaływanie na czynniki transkrypcyjne genów [WICKNER i in., 1991].

Niektórzy autorzy postulują również funkcje anty-apoptotyczne hsp70, mające polegać na unieczynnianiu jednego z czynników inicjujących proces apoptozy [BEERE i in., 2000; SALEH i in., 2000].

Białka stresu obok metalotionein są wykorzystywane jako biomarkery narażenia na obecność nadmiaru metali w środowisku lub w pobieranym pokarmie [SANDERS i in., 1994; DEPLEDGE i in. 1995; KÖHLER i in. 1996a; REGOLI, 1998; TENDEGREN i in., 1999]. Jak dotąd wykazano ich przydatność jako wskaźnik nadmiaru kadmu i miedzi u zwierząt wodnych i lądowych [SANDERS i in., 1994; KÖHLER i in. 1996b; PEDERSEN i in., 1997; ARTS i in., 2004].

Ponieważ dotychczasowe badania wskazują, że u *Isopoda* hsp70 są najbardziej odpowiednim wskaźnikiem w badaniu proteotoksyczności metali [KÖHLER i in., 1992; ECKWERT i in., 1997] podjęto próbę odpowiedzi na pytanie czy białka z rodziny hsp70 u *P. scaber* mogą być także uznawane za dobry biomarker ekspozycji w odniesieniu do niklu.

24-tygodniowa ekspozycja *P. scaber* na nikiel w diecie, spowodowała zależne od stężenia tego metalu różnice w ekspresji białek stresu hsp70 w przewodzie pokarmowym. Osobniki wszystkich grup „niklowych” (Ni 1, Ni 2, Ni 3) charakteryzowało obniżenie względnego stężenia hsp70 w stosunku do kontroli. Najsilniej zahamowana była ekspresja tych białek stresu w grupie eksponowanej na najwyższe stężenie niklu (Ni 3).

Wzorzec reakcji białek stresu w wątrobotrzustce w odpowiedzi na nikiel był nieco inny w porównaniu z przewodem pokarmowym; krzywa zależności stężenie metalu – poziom ekspresji hsp70 miała charakter U-kształtny. Ekspozycja na najwyższe stężenie niklu w diecie (grupa Ni 3) praktycznie nie nasiliła indukcji białek stresu hsp70 względem kontroli; grupy Ni 1 i Ni 2 charakteryzowało natomiast bardzo silne obniżenie stężenia względnego tych białek.

Niektórzy autorzy uważają, że produkcja białek stresu nie zawsze musi być proporcjonalna do (wielkości) intensywności czynnika stresowego. Potwierdzają to dobrze badania PYZY i współpracowników [1997], w których porównywano poziomy hsp70 u wija *Lithobius mutabilis* z terenów położonych w różnej odległości od zakładu przeróbki rud ołowiu i cynku z osobnikami z terenów kontrolnych. Nie stwierdzono różnic w poziomie tych białek pomiędzy osobnikami z terenów kontrolnych i zanieczyszczonych, a ponadto poziomy hsp70 były podobne u osobników zebranych w różnych miejscach gradientu zanieczyszczenia. Wysłunęto wniosek, że

gatunkowo specyficzna tolerancja może być osiągnięta poprzez wzrost ilości hsp tylko do określonego poziomu, charakterystycznego dla danego gatunku. Powodów takich reakcji upatruje się w możliwościach energetycznych organizmu. Koszt ekspresji hsp70 może przeważać korzyści płynące z obecności tych białek w komórce [PYZA i in., 1997]. Tak można by również tłumaczyć wzorec ekspresji białek szoku wykazany w przewodzie pokarmowym *P. scaber*. Wysoki wyjściowy poziom hsp70 u osobników z grupy kontrolnej obniżał się nieznacznie u osobników z grupy Ni 1. U stonóg z grupy Ni 2 był już czterokrotnie niższy od stwierdzonego u osobników kontrolnych. W grupie Ni 3 względne stężenie hsp70 było nawet o 94% niższe. Wskazuje to na wrażliwość tych białek na nikiel i zmniejszanie ich udziału w ochronie przed skutkami jego działania w komórce. Mogą to potwierdzić obrazy uzyskane techniką TEM, wskazujące na znaczne zmiany ultrastruktury komórek przewodu pokarmowego, co pośrednio może wpływać na wszystkie procesy w nim zachodzące, także na produkcję białek stresu. Przy porównaniach wyników badań prowadzonych w terenie i laboratorium trzeba jednak pamiętać, że bardzo często synteza hsp70 jest dużo większa w odpowiedzi na szok termiczny niż na toksyczne związki chemiczne w stężeniach toksycznych [SANDERS, 1990]. Taki kierunek strategii obronnej u *P. scaber* tłumaczą również opisane u tego gatunku strategie rozwojowe w warunkach obciążenia innymi metalami. Już w 1992 DONKER wykazała bowiem, że mechanizmy adaptacyjne na poziomie osobniczym polegają na skróceniu rozwoju i przy mniejszych rozmiarach ciała wcześniejsze podejmowanie procesów rozrodczych bez dbałości o naprawę funkcjonalną organizmu. A więc strategia rozwojowa stonóg prowadzi w takich warunkach do jak najszybszego wejścia w okres rozrodczy, bez kierowania nakładów energetycznych na procesy naprawy w uszkodzonych komórkach. Braku indukcji hsp70 u tych zwierząt w stresie powodowanym wysokimi stężeniami niklu jest więc potwierdzeniem słuszności wcześniejszych obserwacji na poziomie osobniczym i populacyjnym [DONKER, 1992].

Zasadnicze znaczenie w interpretacji wyników uzyskanych dzięki pomiarom odpowiedzi stresowej jest wiedza jak akumulacja białek stresu koreluje z innymi parametrami fizjologicznymi i toksykologicznymi [BIERKENS, 2000]. Zgodnie z tym adekwatność odpowiedzi stresowej należy oceniać mając na uwadze także inne zmiany zachodzące w organizmie. Powiązanie ich ze sobą może dać pełny obraz efektów jakie może wywołać dana substancja w organizmie. Dlatego analizę ekspresji białek hsp70 u *P. scaber* również w tym doświadczeniu powinno się interpretować mając na uwadze pozostałe analizowane parametry.

W podsumowaniu można stwierdzić, że nie wszystkie z użytych w tej pracy wskaźników okazały się dobrymi biomarkerami przydatnymi do oceny wpływu chronicznego zatrucia niklem na *P. scaber*. Niektóre z nich, jak np. ekspresja białek hsp70, okazały się być zmienne, nie dające jednoznacznych odpowiedzi co do stopnia narażenia na Ni. Inne, jak np. aktywność niektórych enzymów związanych z glutationem (GPOX czy GR) wykazały ścisłą zależność od stężenia niklu w pokarmie, ale także stężenia tego pierwiastka w tkankach *P. scaber*. Podobnie było

w przypadku stopnia akumulacji niklu w wątrobotrzustce oraz zmian powstałych pod wpływem tego metalu w komórkach przewodu pokarmowego i wątrobotrzustki. Analogicznie jak w przypadku innych metali można uznać te parametry jako dobre wskaźniki narażenia tych zwierząt na nadmiar niklu, a samego prosionka szorstkiego, jako gatunek użyteczny w biomonitoringu środowiska.

Piśmiennictwo

1. ALLEN R.G., SOHAL R.S. 1986: Role of glutathione in the aging and development of insects. [W:] COLLATZ K.-G., SOHAL R.S. (red.). Insect Aging. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; ss.: 168-181.
2. ARTS M.-J.S.J., SCHILL R.O., KNIGGE T., ECKWERT H., KAMMENG J.E., KOHLER H.-R. 2004: Stress proteins (hsp70, hsp60) induced in isopods and nematodes by field exposure to metals in a gradient near Avonmouth, UK. Ecotoxicology 13(8): 739-755.
3. ASHBURNER M. 1982: The effects of heat shock and other stress on gene activity: an introduction. [W:] SCHLESINGER M.J., ASHBURNER M., TISSIERES A. (red.). Heat Shock: From Bacteria to Man. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; ss.: 1-10.
4. AUGUSTYNIAK M., MESJASZ-PRZYBYŁOWICZ J., NAKONIECZNY M., DYBOWSKA, M., PRZYBYŁOWICZ W., MIGULA P. 2002: Food relations between *Chrysolina pardalina* and *Berkheya coddii*, a nickel hyperaccumulator from south african ultramafic outcrops. Fresen. Environ. Bull. 11: 85-90.
5. AUGUSTYNIAK M., MIGULA P., MESJASZ-PRZYBYŁOWICZ J., TARNAWSKA M., NAKONIECZNY M., BABCZYŃSKA A., PRZYBYŁOWICZ W. 2005: Effects of organophosphorous pesticide to beetle (*Chrysolina pardalina*) feeding on nickel hyperaccumulating plant (*Berkheya coddii*). Abstract Book of the SETAC Europe 15th Annual Meeting, May 22-26 2005, Lille, France; s.: 230.
6. BABCZYŃSKA A., MIGULA P. 2002: Cadmium-fenitrothion interaction in the spider *Pardosa lugubris* and the fruit fly *Drosophila melanogaster*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 69: 586-592.
7. BARGAGLI, R. 1998: Trace elements in the terrestrial plants. Springer-Verlag, New York.
8. BARTOSZ G. 2003: Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie. PWN, Warszawa.
9. BEERE H.M., WOLF B.B., CAIN K., MOSSER D.D., MAHBOUBI A., KUWANA T., TAILOR P., MORIMOTO R.I., COHEN G.M., GREEN D.R. 2000: Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. Nat. Cell Biol. 2: 469-475.
10. BENGTSOON G., NORDSTROM S., RUNDGREN S. 1983: Population density and tissue metal concentration of lumbricids in forest soils near a brass mill. Environ. Pollut. 30: 87-108.
11. BIERKENS J.G.E.A. 2000: Applications and pitfalls of stress proteins in biomonitoring. Toxicology 153: 61-72.
12. BIGNELL D.E. 1984: The arthropod gut as an environment for microorganisms. [W:] ANDERSON J.M. (red.). Invertebrate-Microbial Interactions. Cambridge University Press, Cambridge; ss.: 205-227.
13. BROWN B.E. 1982: The form and function of metal-containing granules in invertebrate tissues. Biol. Rev. 57: 621-667.
14. CAIN B.W., PAFFORD E.A. 1981: Effects of dietary nickel on survival and growth of mallard ducklings. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 10: 737-745.
15. CHANG L.W. (red.) 1996: Toxicology of Metals. CRC Press, Boca Raton, FL.
16. CHAU Y.K., KULIKOVSKY-CORDEIRO O.T.R. 1995: Occurrence of nickel in the Canadian environment. Environ. Rev. 3: 95-120.

17. CHIANG H.-L., TERLECKY S.R., PLANT C.P., DICE J.F. 1989: A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. *Science* 246: 382-385.
18. DALLINGER R., RAINBOW P.S. 1993: *Ecotoxicology of metals in invertebrates*. Lewis Publishers, Boca Raton.
19. DALLINGER R., BERGER B., BIRKEL S. 1992: Terrestrial isopods: Useful biological indicators of urban metal pollution. *Oecologia* 89: 32-41.
20. DAVIS R.C., HASSAL M., SUTTON S.L. 1977: The vertical distribution of isopods and diplopods in a dune grassland. *Pedobiologia* 17: 320-329.
21. DEPLEDGE, M.H., AAGAARD, A., GYÖRKÖS, P. 1995: Assessment of trace behavioural biomarkers. *Mar. Pollut. Bull.* 31: 19-27.
22. DONKER, M.H. 1992: Physiology of metal adaptation in the isopod *Porcellio scaber*. Febo-druk-Enschede.
23. DONKER M.H., BOGERT C.G. 1991: Adaptation to cadmium in three populations of the isopod *Porcellio scaber*. *Comp. Biochem. Physiol.* 100C: 143-146.
24. DROBNE D. 1997: Terrestrial isopods – a good choice for toxicity testing of pollutants in the terrestrial environment. *Environ. Toxicol. Chem.* 16: 1159-1164.
25. ECKWERT H., ALBERTI G., KÖHLER H.-R. 1997: The induction of stress proteins (hsp) in *Oniscus asellus* (Isopoda) as a molecular marker of multiple heavy-metal exposure: I. Principles and toxicological assessment. *Ecotoxicology* 6: 249-262.
26. EISLER R. 2000: *Handbook of chemical risk assessment. Health hazards to humans, plants and animals. Vol. 1. Metals*. Lewis Publishers, Boca Raton, London, New York, Washington, D.C.
27. ELEFANT F., PALTER K.B. 1999: Tissue-specific expression of dominant negative mutant *Drosophila* HSC70 causes developmental defects and lethality. *Mol. Biol. Cell* 10: 2101-2117.
28. ELLIS R.J., VANDER VIES S.M. 1991: Molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.* 60: 321-347.
29. GETHING M.-J., SAMBROOK J. 1992: Protein folding in the cell. *Nature* 355: 33-45.
30. HARTWIG A., KRUGER I., BEYERSMANN D. 1994: Mechanisms in nickel genotoxicity: the significance of interactions with DNA repair. *Toxicol. Lett.* 72: 353-358.
31. HASSALL M., TURNER J.G., RANDS M.R.W. 1987: Effects of terrestrial isopods on the decomposition of woodland leaf litter. *Oecologia* 72: 597-604.
32. HOLDICH D.M., RATCLIFFE N.A. 1970: A light and electron microscope study of the hindgut of the herbivorous isopod *Dynamene bidentata*. *Z. Zellforsch.* 111: 209-227.
33. HONDA K., NASU T., TATSUKAWA R. 1984: Metal distribution in the earthworm, *Pheretima hilgendorfi*, and their variations with growth. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 13: 427-432.
34. HOPKIN S.P. 1989: *Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates*. Elsevier Appl. Sci., London, New York.
35. HOPKIN S.P. 1990: Critical concentrations, pathways of detoxification and cellular ecotoxicology of metals in terrestrial arthropods. *Funct. Ecol.* 4: 321-327.
36. HOPKIN S.P., MARTIN M.H. 1982: The distribution of zinc, cadmium, lead and copper within the hepatopancreas of a woodlouse. *Tissue Cell* 14: 703-715.
37. HOPKIN S.P., MARTIN M.H. 1984: Heavy metals in woodlice. [W:] SUTTON S.L.D., HOLDICH M. (red.). *The Biology of Terrestrial Isopods*. Sym. Zool. Soci. Lond. 53: 143-166.
38. HOPKIN S.P., HARDISTY G.N., MARTIN M.H. 1986: The woodlouse *Porcellio scaber* as a 'biological indicator' of zinc, cadmium, lead and copper pollution. *Environ. Pollut.* 11B: 271-290.
39. HOPKIN S.P., JONES D.T., DIETRICH D. 1993: The isopod *Porcellio scaber* as a monitor of the bioavailability of metals in terrestrial ecosystems: towards a global 'woodlouse watch' scheme. *Sci. Total Environ.* 1993S: 357-365.

40. HORNING E. 1991: Isopod distribution in a heterogeneous grassland habitat. [W:] JUHAULT P., MOCQUARD J.P. (red.). Third Symposium on the Biology of Terrestrial Isopods. University Press, Poitiers., ss.: 73-79.
41. HORNING E., WARBURG M.R. 1995: Seasonal changes in the distribution and abundance of isopod species in different habitats within the Mediterranean region of northern Israel. *Acta Oecol.* 16(4): 431-445.
42. JI L.L., LEEUWENBURGH C. 1996: Glutathione and exercise. [W:] SOMANI S.M. (red.). *Pharmacology in Exercise and Sport*. CRC Press, Inc. Boca Raton, New York, London, Tokyo; ss.: 97-120.
43. KASPRZAK K.S. 1987: Nickel. *Adv. Mod. Environ. Toxicol.* 11: 145-183.
44. KÖHLER H.-R., TRIEBSKORN R., STÖCKER W., KLOETZEL P.-M., ALBERTI G. 1992: The 70 kD heat shock protein (hsp 70) in soil invertebrates: A possible tool for monitoring environmental toxicants. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 22: 334-338.
45. KÖHLER H.-R., HÜTTENRAUCH K., BERKUS M., GRAFF S., ALBERTI G. 1996a: Cellular hepatopancreatic reactions in *Porcellio scaber* (Isopoda) as biomarkers for the evaluation of heavy metal toxicity in soils. *Appl. Soil Ecol.* 3: 1-15.
46. KÖHLER H.-R., RAHMAN B., GRAFF S., BERKUS M., TRIEBSKORN R. 1996b: Expression of stress protein family (Hsp70) due to heavy metal contamination in the slug *Deroceras reticulatum*. *Chemosphere* 33: 1327-1340.
47. KORSLOOT A., VAN GESTEL C.A.M., VAN STRAALEN N.M. 2004: Environmental stress and cellular response in arthropods. London, Boca Raton.
48. LINDQUIST S. 1986: The heat-shock response. *Annu. Rev. Biochem.* 55: 1151-1191.
49. LUDWIG M., ALBERTI G. 1988: Mineral congregations, 'spherites' in the midgut gland of *Coleotus terrestris* (Araneae) structure, composition and function. *Protoplasma* 143: 43-50.
50. MA W.C. 1982: The influence of soil properties and worm-related factors on the concentration of heavy metals in earthworms. *Pedobiologia* 24: 109-119.
51. MARTIN M., H., DUNCAN E. M., COUGHTERY P.J. 1982: The distribution of heavy metals in a contaminated woodland system. *Env. Pollut.* 3: 147-157.
52. MEISTER A. 1995: Glutathione metabolism. *Method. Enzymol.* 251: 3-7.
53. MIGULA P. 1991: Strategie adaptacyjne bezkręgowców do środowisk zanieczyszczonych metalami ciężkimi. *Biotechnologia* 3-4 (13-14): 49-62.
54. MIGULA P., ŁASZCZYCA P., AUGUSTYNIAK M., WILCZEK G., ROZPĘDEK K., KAFEL A., WOŁOSZYN M. 2004: Antioxidative defence enzymes in beetles from a metal pollution gradient. *Biologia, Bratislava.* 59: 645-654.
55. MORGAN J., ROWSON M., INGRAM K., BRABHAM P., JONES R., O'REILLY M., DAVIES S. 2005: Spatial distribution of nickel in soils and biota in the vicinity of a working nickel smelter. Abstract Book of the SETAC Europe 15th Annual Meeting, May 22-26 2005, Lille, France; s.: 247.
56. NOVER L. 1991: Heat Shock Response. CRC Press, Boca Raton.
57. ODENDAAL J.P., REINECKE A.J. 1999: The sublethal effects and accumulation of cadmium in the terrestrial isopod *Porcellio scaber* LATR. (Crustacea, Isopoda). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36: 64-69.
58. ODENDAAL J.P., REINECKE A.J. 2003: Quantifying histopathological alterations in the hepatopancreas of the woodlouse *Porcellio laevis* (Isopoda) as a biomarker of cadmium exposure. *Ecotox. Environ. Saf.* 56: 319-325.
59. PARDINI R.S. 1995: Toxicity of oxygen from naturally occurring redox-active prooxidants. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 29: 101-118.

60. PEDERSEN S.N., LUNDEBYE A.K., DEPLEDGE H.H. 1997: Field application of metallothionein and stress protein biomarkers in the shore crab *Carcinus meanas* exposed to trace metals. *Aquat. Toxicol.* 37: 183-200.
61. PROSI F., DALLINGER R. 1988: Heavy metals in terrestrial isopod *Porcellio scaber* LATREILLE. Histochemical and ultrastructural characterization of metal-containing lysosomes. *Cell Biol. Toxicol.* 4: 81-96.
62. PROSI F., STORCH V., JANSSEN H.H. 1983: Small cells in the midgut glands of terrestrial isopods: sites of heavy metal accumulation. *Zoomorphology* 102: 53-64.
63. PYZA E., MAK P., KRAMARZ P., LASKOWSKI R. 1997: Heat shock proteins (HSP70) as biomarkers in ecotoxicological studies. *Ecotox. Environ. Saf.* 38: 244-251.
64. REGOLI F. 1998: Trace metals and antioxidant enzymes in gills and digestive glands of the Mediterranean blue mussel *Mytilus trossulus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 34: 48-63.
65. RITOSSA, F. 1962: A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18: 571-573.
66. RODRIGUEZ R.E., MISRA M., DIWAN B.A., RIGGS C.W., KASPRZAK K.S. 1996: Relative susceptibilities of C57BL/6X, (C57BL/6 x C3H/He)F₁ and C3H/He mice to acute toxicity and carcinogenicity of nickel subsulfide. *Toxicology* 107: 131-140.
67. SALEH A., SRINIVASULA S.M., BALKIR L., ROBBINS P.D., ALNEMRI E.S. 2000: Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat. Cell Biol.* 2: 476-483.
68. SANDERS B.M. 1990: Stress proteins: potential as multitiered biomarkers. [W:] MCCARTHEY J.F., SHUGART L.S. (red.). Biomarkers of environmental contamination. Lewis Publishers, Boca Raton, FL.; ss.: 165-192.
69. SANDERS B.M. 1993: Stress proteins in aquatic organisms: an environmental perspective. *Crit. Rev. Toxicol.* 23: 49-75.
70. SANDERS B.M., MARTIN L.S., HOWE S.R., NELSON W.G., HEGRE E.S., PHELPS D.K. 1994: Tissue-specific differences in accumulation of stress proteins in *Mytilus edulis* exposed to a range of copper concentrations. *Toxicol. Appl. Pharm.* 125: 206-213.
71. SEVIN I.F. 1980: Nickel. [W:] WALDRON, H.A. (red.). Metals in the Environment. Academic Press, London; ss.: 263-291.
72. SUNDERMAN JR F.W., AITO A., BERLIN A., BISHOP C., BURINGH E., DAVIS W., GOUNAR M., JACQUIGNON P.C., MASTROMATTEO E., RIGAUT J.P., ROSENFELD C., SARACCI R., SORS A. (red.) 1984: Nickel in the human environment. IARC Sci. Publ. No. 53. Int. Agen. Res. Cancer, Oxford Univ. Press.
73. SUTTON S.L. 1980: Woodlice. Pergamon Press, Oxford.
74. TAYLOR, M.G., SIMKISS, K. 1990: Structural and analytical studies on metal ion-containing granules. [W:] MANN S. (red.). Chemical Perspectives in Biomineralization. VCH Publishers, New York, ss.: 427-460.
75. TENDEGREN M., OLSSON B., BRADLEY B., ZHOU L. 1999: Heavy metal uptake, physiological response and survival of the Blue mussel (*Mytilus edulis*) from marine and brackish waters in relation to the induction of heat shock protein 70. *Hydrobiologia* 393: 261-269.
76. TISSIERES A., MITCHELL H.K., TRACEY U.M. 1974: Protein synthesis in salivary glands of *D. melanogaster*. Relation to chromosome puffs. *J. Mol. Biol.* 84: 389-398.
77. TYLER G., BALSBERG PAHLSSON A.-M., BENGTSSON G., BAATH E., TRANVIK L. 1989: Heavy-metal ecology of terrestrial plants, microorganisms and invertebrates. *Water Air Soil Poll.* 47: 189-215.
78. U.S. Environmental Protection Agency (USEPA) 1980: Ambient water quality criteria for nickel. U.S. Environmental Protection Agency Report. 440/5-80-060.

79. U.S. Environmental Protection Agency (USEPA) 1985: Drinking water criteria document for nickel. U.S. Environmental Protection Agency Report, 600/X-84-193-1.
80. U.S. Public Health Service (USPHS) 1993: Toxicological profile for nickel. USPHS, Agen. Toxic. Subs. Dis. Regis., Atlanta, GA, Rep. TP-92/14.
81. VAN GESTEL C.A.M., KOOLHAAS J.E. 2004: Water-extractability, free ion activity, and pH explain cadmium sorption and toxicity to *Folsomia candida* (Collembola) in seven soil-pH combinations. *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 1822-1833.
82. VAN GESTEL C.A.M., DIRVEN-VAN BREEMEN E.M., BAERSELMAN R. 1993: Accumulation and elimination of cadmium, chromium and zinc and effects on growth and reproduction in *Eisenia andrei* (Oligochaeta, Annelida). *Sci. Total Environ.* 585-597.
83. VAN STRAALEN N.M. 1998: Evaluation of bioindicator systems derived from soil arthropod communities. *Appl. Soil Ecol.* 9: 429-437.
84. VAN WENSEM J. 1989: A terrestrial micro-ecosystem for measuring effects of pollutants on isopod-mediated litter decomposition. *Hydrobiologia* 188/189: 507-516.
85. VIARENGO A., BETTELLA E., FABBRI R., BERLANDO B., LAFAURIE M. 1997: Heavy metal inhibition of EROD activity in liver microsomes from the bass *Dicentrarchus labrax* exposed to organic xenobiotics: role of GSH in the reduction of heavy metal effects. *Mar. Environ. Res.* 44(1): 1-11.
86. WARBURG M.R. 1995: Growth and reproduction in a rare desert isopod: *Porcellio barroisi* (Oniscidea: Porcellionidae) from the Central Negev Mountains. *J. Arid. Environ.* 31(2): 199.
87. WEBB M., CAIN K. 1982: Functions of metallothionein. *Biochem. Pharmacol.* 31(2): 137-142.
88. WELCH W.J. 1993: How cells respond to stress. *Sci. Am.* 268(5): 56-64.
89. WHITE, S.L., RAINBOW, P.S. 1986: A preliminary study of Cu-, Cd- and Zn-binding components in the hepatopancreas of *Palaemon elegans* (Crustacea, Decapoda). *Comp. Biochem. Physiol.* 83C: 111-116.
90. WICKNER S., HOSKINS J., MCKENNY K. 1991: Function of DnaJ and DnaK as chaperones in origin-specific DNA binding by RepA. *Nature* 350: 165-167.
91. WIESER W. 1968: Aspects of nutrition and the metabolism of copper in isopods, *Am. Zool.* 8: 495-506.
92. WIESER W., KLIMA J. 1969: Compartmentalization of copper in the hepatopancreas of isopods. *Mikroskopie* 24: 1-9.
93. WILCZEK G. 2005: Apoptosis and biochemical biomarkers of stress in spiders from industrially polluted areas exposed to high temperature and dimethoate. *Comp. Biochem. Physiol.* 141C: 194-206.
94. WILCZEK G., BABCZYŃSKA A., AUGUSTYŃIAK M., MIGULA P. 2004: Relations between metals (Zn, Pb, Cd and Cu) and glutathione-dependent detoxifying enzymes in spiders from a heavy metal pollution gradient. *Environ Pollut.* 132(3): 453-61.
95. WONG V.W.T., RAINBOW P.S. 1986: Two metallothioneins in the shore crab *Carcinus maenas*. *Comp. Biochem. Physiol.* 83A: 149-156.
96. World Health Organization (WHO) 1991: Nickel. *Environ. Health Crit.* 108.
97. YU, B.P. 1994: Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* 74: 139-162.
98. ŽNIDARŠIČ N., ŠTRUS J., DROBNE D. 2003: Ultrastructural alterations of the hepatopancreas in *Porcellio scaber* under stress. *Environ. Toxicol. Phar.* 13: 161-174.